

## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant	:	Remacle et al.
Appl. No.	:	10/035,822
Filed	:	December 27, 2001
For	:	DETECTION AND/OR QUANTIFICATION METHOD OF A TARGET MOLECULE BY A BINDING WITH A CAPTURE MOLECULE FIXED ON THE SURFACE OF A DISC
Examiner	:	Sisson, Bradley L.
Group Art Unit	:	1634

DECLARATION OF PRIOR INVENTION IN THE UNITED STATES TO OVERCOME  
CITED PUBLICATION UNDER 37 CFR 1.131**Mail Stop Amendment**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

1. The declaration is to establish conception of the invention claimed in this application and due diligence in reducing it to practice in a WTO country at a date prior to the date prior to November 12, 1997, the filing date of the Wang reference (USP 5,922,617) cited by the Examiner in the above-identified application. The claimed invention encompasses a compact disc (CD) or a DVD having capture molecules covalently bound to the CD/DVD surface and registered binary data concerning characteristics of the capture molecules which can be read by a CD/DVD reading device.

2. The persons making this declaration are the named co-inventors.

3. To establish the date of conception of the invention of this application, the following true copies and their translations are submitted as evidence: Exhibits A and B: letter sent prior to November 12, 1997 (Exhibit A) by the lead inventor, Jose Remacle, to Mr. Pierre Villers, the Director of the General Direction of Technologies, Research and Energy (DGTRE)

Appl. No. : 10/035,822  
Filed : December 27, 2001

from the Walloon Region and English translation of the letter (Exhibit B). Exhibits C and D: Work proposal (Exhibit C) on the use of laser beams to detect binding of target nucleic acids to capture nucleic acids bound to compact discs which accompanied the foregoing letter and English translation of the work proposal (Exhibit D).

4. Exhibits A-D show that prior to November 12, 1997, Dr. Jose Remacle had conceived of the detection of target nucleic acids bound to nucleic acid capture molecules on the surface of a compact disc. The proposal describes attaching DNA probes to the CD by activating a photoactivatable group of the DNA probe, fixing molecules to the attached DNA probes thereby producing a detectable signal; and detecting the signal resulting from binding of a target nucleic acid to a nucleic acid capture molecule.

5. The Evidence establishes conception of the claimed invention prior to November 12, 1997.

6. The above-identified application claims the benefit of US Provisional Application No.: 60/071,726 filed on December 30, 1997. Thus, the invention was diligently reduced to practice.

7. I declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful, false statement and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful, false statements may jeopardize the validity of the application or patent issuing therefrom.

Dated: 30 December 2001

By: \_\_\_\_\_

Jose Remacle

Dated: 30 December 2001

By: \_\_\_\_\_

Isabelle Alexandre

# EXHIBIT A



**Laboratoire de Biochimie et biologie Cellulaire**

Professeur José REMACLE  
Professeur Martine RAES  
Docteur Carine MICHIELS  
Docteur Rose THIBAUT  
Docteur Olivier TOUSSAINT  
Docteur Isabelle ERNEST

Monsieur Pierre Villers  
Directeur  
DGTRE  
Avenue Prince de Liège 7  
5100 Jambes

Rue de Bruxelles, 61  
B-5000 NAMUR (Belgique)

Namur, le 2-11-97

Cher Monsieur Villers,

Puis-je vous faire parvenir ci-joint une proposition de travail sur l'utilisation de la détection par faisceau laser et les compacts disques pour la détection des sondes à ADN.

Nous avons proposé un projet court qui consistera à montrer la faisabilité technique minimale des 3 étapes essentielles pour le développement d'un système intégré de détection des sondes à ADN sur un compact disque en utilisant la détection par réflexion de rayonnement laser tel qu'il est utilisé pour la lecture des CD actuels. Ces trois étapes sont d'une part l'adressage des sondes sur le disque, la formation d'un produit de réaction et enfin la lecture du signal obtenu par réflexion d'un faisceau laser.

Notre proposition de travail pour ces trois étapes repose sur des bases solides (des technologies déjà développées dans nos labos), nous sommes convaincus que les objectifs fixés peuvent être atteints même s'il convient de préciser que ce travail servira à tester la faisabilité du système proposé et non pas à aboutir à un prototype. La réalisation de celui-ci devrait constituer une deuxième étape du développement dans laquelle une ou des sociétés connaissant la technologie de lecture et d'adressage de CD devraient être impliquées.

Etant donné l'originalité de cette technologie et les enjeux potentiels nous proposons de déposer un brevet provisoire. Celui-ci n'est valable que pour un an et après cette période un brevet complet doit être déposé. Cette contrainte nous force à démontrer le plus rapidement possible la faisabilité de la technologie. Pour la même raison, nous aimerions si possible qu'il n'y ait pas de communiqué de presse ou en tout cas que le terme compact disque n'y apparaisse pas.

Les perspectives d'une telle technologie sont gigantesques puisque non seulement l'on pourrait greffer et détecter les séquences d'ADN mais l'on pourrait aussi y greffer des anticorps pour les tests ELISA ou des récepteurs pour screener des agonistes ou antagonistes (ou l'inverse). Les revendications du brevet provisoire reprendront ces diverses applications.

Ce projet me tient personnellement très à coeur étant donné son originalité et son impact possible dans la course aux développements technologiques pour les méthodes de diagnostics et de screening moléculaires rapides et peu coûteuses. Elles sont dans leur phase de développement et nous pouvons donc prendre une place de choix grâce à des avancées technologiques telles que proposées ici.

Je vous remercie encore sincèrement de votre accueil et j'espère que vous considèrerez favorablement ce projet.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'José Remacle', with a long, sweeping horizontal stroke extending to the right.

José Remacle

# EXHIBIT B



Laboratoire de Biochimie et biologie Cellulaire

Professeur José REMACLE  
Professeur Martine RAES  
Docteur Carine MICHIELS  
Docteur Rose THIBAUT  
Docteur Olivier TOUSSAINT  
Docteur Isabelle ERNEST

Rue de Bruxelles, 61  
B-5000 NAMUR (Belgique)

Monsieur Pierre Villers  
Directeur  
DGTRE  
Avenue Prince de Liège 7  
5100 Jambes

Namur, le 2-11-97

Dear Mr. Villers,

Please find enclosed a work proposal on the use of a laser beam detection mean and compact discs for the detection of DNA probes.

We have proposed a short project which aims to show the minimal technical feasibility of the 3 essential steps for the development of an integrated system for the detection of DNA probes on a compact disc using detection of a laser beam reflection as used for the reading of actual CD. These three steps are: addressing the probes on the disc, the formation of a reaction product and finally the reading of the obtained signal by reflection of a laser beam.

Our work proposal for these three steps relies on solid basis (technologies already developed in our labs) and we are convinced that the proposed objectives can be reached even if the project aims to test the feasibility of the proposed system and not to provide a prototype. Development of a prototype should be considered in a second step in which one or more companies, who know the technology of reading and addressing the CD, would be involved.

Given the originality of this technology and its potential stakes, we propose to file a provisional patent application. This one is only valid for one year and after this time period, a full patent has to be filed. This constraint forces us to demonstrate as soon as possible the feasibility of the technology. For the same reason, we would like if possible that there is no press release or at least that the term "compact disc" is not mentioned.

Perspectives of such technology are huge since we would be able to graft and detect DNA sequences and we could also graft antibodies for ELISA testing or receptors for the screening of agonists and antagonists (or conversely). The claims of the provisional filing will cover all these applications.

This project is very important to me, given its originality and possible impact on technological development of diagnostic methods and molecular screening fast and cheap. Since

these technologies are in their development phase, we could take a place of choice due to technological advanced like the one proposed here.

I thank you sincerely for you invitation and hope you will consider positively this project.

José Remacle



# EXHIBIT C

## Détection de sondes à ADN sur CD

### Objectif

L'objectif final du projet est de produire un compact-disque (C-D) qui permette la détection de séquences d'ADN dans un but de diagnostic. Il s'agit d'utiliser le C-D comme support pour réaliser une hybridation de l'ADN et de pouvoir le mesurer en utilisant la technique de détection par faisceau laser actuellement en place dans les lecteurs de C-D.

Le but de cette recherche précompétitive sera de démontrer la faisabilité minimale des trois étapes essentielles du principe de la technologie à savoir, la fixation des sondes, son marquage et la détection de la présence de ces sondes à ADN sur le CD.

### **Avantages de l'utilisation du CD et du faisceau laser**

Le CD est un support universellement répandu qui permet de stocker un nombre très élevé d'informations et dont le prix ainsi que les appareils de lecture sont très bon marché. De plus ils ont été développés pour que leur information soit directement traduite sur support informatique. L'idée que l'on pourrait utiliser ce support et tous les accessoires de lecture et de traitement du signal qui l'entoure pour détecter des séquences d'ADN n'a jamais été proposée. Si cette proposition semble peut être futuriste aujourd'hui, il faut se rappeler que lorsque les puces de microélectronique ont été proposées il y a 5 ans pour greffer de l'ADN, c'était aussi une idée osée et l'on voit maintenant se répandre cette technologie dans plusieurs sociétés. Nous avons indiqué ci-dessous quelques avantages de cette double technologie à savoir l'utilisation de compacts disques comme support et du faisceau laser pour la détection.

1. Possibilité d'adressage de l'ADN en faisant réagir une sonde par tout un groupement photoactivable pour le greffage sur le support.
2. Possibilité de fixation sur l'ADN de molécules qui provoquent un dépôt coloré ou une émission de lumière ou une fluorescence après excitation par un faisceau laser.
3. Possibilité d'adapter un lecteur de compact disque pour la lecture de la lumière réfléchie ou diffractée en présence du produit de la réaction d'une enzyme comme la peroxydase ou la mesure d'une émission de photons.
4. Possibilité de localisation précise du signal sur le disque.
5. Utilisation d'appareillages universellement répandus et bon marché pour la lecture de plaques et pour leur fabrication.

6. Traitement immédiat des données sur l'ordinateur.
7. Enorme potentiel de stockage de l'information et donc de séquences à détecter
8. Adaptation possible pour d'autres applications comme la détection d'anticorps, d'antigènes ou de récepteurs

### **Réalisation du projet**

#### **1. Etude du greffage des sondes à ADN sur disque**

Il s'agit d'abord de pouvoir fixer une sonde à ADN sur un support CD à un endroit bien déterminé. C'est l'étape d'adressage de la sonde. Nous voudrions réaliser l'adressage de la sonde en utilisant la précision obtenue par le faisceau laser. La méthode que nous préconisons est basée sur la propriété des groupements chimiques azido-nitrophenyl de pouvoir être activés en présence de lumière et de réagir à l'endroit où cette lumière est localisée. Nous avons choisi le sulfosuccinimidyl 6-(4' -azido-2' - nitrophenylamino)- hexanoate de formule (vendu par Pierce n° 22589).

Ce dérivé bifonctionnel possède un groupement N-hydroxysuccinimide qui réagit sur les groupements  $\text{NH}_2$  libres et donc peut être fixé sur les sondes aminées à ADN. Son groupement azido-nitrophenyl peut alors être activé par la lumière et se fixer sur un support portant des fonctions amines. Une application vient d'être publiée par Dontha et al. (Anal. Chem. 69, 2619, 1997) sur la fixation de biotine portant un groupement azido-nitrophenyl sur un support solide par activation au laser.

Nous commencerons par fixer sur un CD recouvert de phtalate de la biotine activée par un groupement azido-nitrophenyl. Le phtalate sera carboxylé

puis aminé par une méthode que nous avons mis au point au labo et publiée (Zammatteo et al., Anal. Biochem. 236, 85-94, 1996; Zammatteo et al. Anal. Biochem., in press, 1997).

La biotine sera fixée sur ce support en présence de lumière et sa fixation suivie grâce à un complexe streptavidine-peroxydase. La détection de la peroxydase peut se faire par un substrat qui donne un produit coloré (TMB), par un substrat (le luminol) qui produit un photon, c'est la chemoluminescence ou par un substrat (le DAB) qui donne un produit insoluble qui se dépose à l'endroit où la peroxydase est localisée. Nous utilisons d'abord un dosage en solution puis un produit insoluble.

Une fois les conditions d'illumination, de  $\lambda$ , de concentrations étudiées, nous réaliserons la même expérience avec une sonde à ADN biotinylée sur laquelle nous aurons fixé un groupe azido-nitrophenyl.

La couche de phtalate sera par la suite desposée au-dessus d'une courbe d'or afin d'obtenir une réflexion de la lumière laser.

Nous examinerons en parallèle la réaction de fixation des sondes directement sur la courbe d'or fonctionnalisée par des groupements amines. La fixation de groupements amines sur l'or se réalise en mettant en contact cette surface en présence de dérivés alcanes aminés. Ces chaînes d'alkyles s'adsorbent de manière très stable sur l'or. Ce procédé sera préféré à celui du phtalate car il permet d'utiliser les CD-R actuels qui sont recouverts d'une pellicule d'or nécessaire à la réflexion de la lumière.

## **2. Etude de la taille du dépôt de réaction formé sur le disque**

La deuxième étape du travail consiste à réaliser des dépôts provenant du produit de la réaction de la peroxydase et à optimiser la formation de dépôts

ayant une taille proche du micromètre, c'est-à-dire proche des renflements provoqués lors de l'impression d'un disque CD (Rom).

Les travaux se réaliseront d'abord sur un support recouvert de biotine et sur laquelle est fixé un conjugué streptavidine-peroxydase (cfr. point 1).

Nous étudierons la taille du produit formé ainsi que sa forme en les observant au microscope électronique à balayage. Les conditions de réaction, temps, température, concentrations en substrat, seront ajustées afin de réaliser des dépôts proches du micromètre.

Nous utiliserons les sondes à ADN fixées sur ce CD (cfr. point 1) et réaliserons le dépôt de produit. Dans ce cas, nous ferons varier la quantité de sondes fixées afin d'examiner l'espacement des dépôts sur le disque. L'idéal serait d'arriver à espacer les dépôts de l'ordre de 1 à 10  $\mu\text{M}$  afin d'avoir une structure de lecture qui se rapproche de celle des CD (Rom).

### **3. Etude du signal laser**

Les dépôts réalisés sur la surface du CD devraient modifier fortement la réflexion du faisceau laser et donc entraîner une variation dans la détection par la photo-diode. Cette variation pourra alors être enregistrée comme une valeur de lecture. C'est le principe de lecture des CD (Rom).

Pour ce faire, nous illuminerons une surface recouverte d'or et étudierons la réflexion sur une surface non recouverte et une surface recouverte par ces dépôts de réaction comme décrit au point 2 et nous enregistrerons les variations de lumière. La lecture se fera en faisant bouger la plaque à vitesse lente grâce à un système d'adressage, afin de pouvoir suivre cet enregistrement. Cette partie nécessite une infrastructure de physique de détection des lasers. Ce procédé sera semblable à celui utilisé dans les lecteurs de CD.

Ce projet de travail représente une proposition élaborée sur base de la littérature et des données techniques disponibles. Il n'est pas exclu cependant que en cours de travail, certaines parties soient modifiées et qu'une stratégie alternative soit proposée si elle se révèle plus efficace. L'essentiel est, d'une part, de proposer un couplage et un adressage aisés des sondes à ADN sur CD et, d'autre part, d'utiliser une méthode de détection si possible adaptable aux appareils actuels de lecture des CD.

### **Plan de travail**

Etude de faisabilité de la méthode.

1. Etude du greffage des sondes à ADN sur disque
  - 1.1. Greffage par photo-activation de la biotine utilisant un dérivé azido-nitrophenyl-biotine.  
Détection par un conjugué streptavidine-peroxydase.
  - 1.2. Greffage par photo-activation d'une sonde à ADN portant sur un groupement azido-nitrophenyl.  
Détection en radioactivité par impression photographique,  
détection par un conjugué streptavidine-peroxydase en utilisant une sonde biotinylée.
2. Etude de la taille du dépôt formé sur le disque.

Utilisation d'un support recouvert par de la biotine et fixation du conjugué streptavidine-peroxydase. Etude de la taille du dépôt du produit de la peroxydase en fonction du temps et de la concentration en substrat.

La taille du dépôt sera suivie au microscope à balayage et comparée à la taille des bosses créées lors d'une impression d'un CD (Rom).

Les conditions de réaction seront ajustées afin d'obtenir des dépôts de taille équivalente soit environ 1  $\mu\text{m}$ .

3. Etude de la variation de signal d'un faisceau laser lors du passage sur un dépôt de produit de la peroxydase.

Un faisceau laser semblable à celui utilisé dans les lecteurs de CD sera dirigé sur la surface et la variation dans l'intensité de réflexion mesurée.

**Personnel non rémunéré à charge de la convention**

J. Remacle	Professeur	occupé à 20 %
J.-J. Pireaux	Professeur	occupé à 20 %
M. Dieu	Ingénieur	occupé à 30 %
E. Delaive	Technicien A1	occupé à 20 %
Y. Houbion	Ingénieur	occupé à 20 %
I. Alexandre	Licenciée en Sciences	occupée à 20 %



**Budget (en Kfrs)****Personnel**

	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>Total</b>
I Docteur en Sciences (ou licencié avec ancienneté) (6mois)	3 600	2400 (1 an)	1 200
I Docteur en Sciences (ou licencié avec ancienneté) mois)	<u>2 400</u>	1 200 (6 mois)	1 200 (6
<b>Sous-total</b>	<b>3 600</b>	<b>2 400</b>	<b>6 000</b>

**Fonctionnement**

	<b>1998</b> (1 an)	<b>1999</b> (6 mois)	<b>Total</b>
Réactifs de labo et petit matériel	1 600	1 000	3 600
Sous-traitance <sup>1</sup>	500	500	1 000
Voyages (dont aux USA)	150	150	300
<b>Sous-total :</b>	<b>2 250</b>	<b>1 650</b>	<b>3 900</b>

<b>Overheads (5 %)</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>Total</b>
	293	203	496

**Matériel**

- Diode laser visible et détecteur à semi-conducteur
- Diode laser - UV visible pour adressage
- Table d'adressage et poste de travail pour électronique de contrôle

<b>Prix total du montage</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>Total</b>
	1 300	-	1 300

<sup>1</sup> (CD adaptés au greffage, Expertise laser)

---

<b>Total général :</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>Total</b>
	<b>7 443</b>	<b>4 253</b>	<b>11 696</b>

**Justification du matériel**

- Le diode laser visible (634 nm) et le détecteur serviront à mesurer la réflexion du laser à la surface du disque modifié.
- Le diode laser - UV visible servira à réaliser l'adressage par activation du groupement photo-sensible.
- La table d'adressage permettra de positionner la lecture du laser.
- L'électronique de contrôle servira au contrôle du système et à l'acquisition des données.

### Plannification

Le premier scientifique s'occupera de la biochimie du greffage et de l'étude du dépôt de la réaction sur le filtre.

Le deuxième scientifique sera un physicien qui réalisera le montage de mesure de la réflexion laser sur le disque modifié. Il sera engagé après 6 mois afin de pouvoir disposer de disques déjà greffés.

Le projet commencerait le 1er janvier 1998 jusqu'au 30 juin 1999.

Etapes du travail	1er semestre (1998)	2ème semestre (1998)	3ème semestre (1999)
I	Etape1(1 Biochimiste) →		
II		Etape2(1 Biochimiste)	Etape2(1 Biochimiste) →
III		Etape 3(1physicien)	Etape 3(1physicien) →

**Intérêt scientifique**

Il s'agit d'une approche tout à fait originale et qui représente un challenge scientifique évident à savoir coupler la technique de dosage de l'ADN basée sur l'utilisation de sondes à ADN avec la technique d'adressage et de détection par rayonnement laser.

La réalisation de ce projet de faisabilité se base malgré tout sur de solides connaissances dans chacune des étapes qui seront investiguées : le greffage des sondes à ADN est bien connu au laboratoire de biochimie ainsi que les réactions biochimiques basées sur l'utilisation de la peroxydase. Les études d'émissions spectroscopiques sont elles bien développées au laboratoire LISE du Professeur J.-J. Pireaux.

# EXHIBIT D

## **Detection of DNA probes on CD**

### **Objective**

The final objective of the project is to produce a compact disc (C-D) which allows the detection of DNA sequences for diagnostic purpose. The objective is to use a C-D as support to perform DNA hybridization and to be able to measure it using as technology for the detection a laser beam currently used in C-D readers.

The aim of this pre-competitive research will be to demonstrate the minimal feasibility for the three essential steps of the principle of this technology, i.e. fixation of the probes, their labelling and detection of the presence of the DNA probes on the CD.

**Advantages of using a CD and a laser beam**

The CD is a support universally used which allows storing a huge amount of data and for which the price is low and the reading device is very cheap. Moreover, they were developed in order to have a direct translation of the information on a data processed support. The idea that such support could be used with a reading and signal processing device to detect DNA sequences has never been proposed. If this proposal seems to be pure fiction today, one may remind that when electronic chips have been proposed 5 years ago to graft DNA, it was an amazing idea and one knows that this technology is now used by several companies. We provide here below a few advantages of this double technology, i.e. the use of compact disc as support and a laser beam for the detection.

1. Possibility to address and graft DNA on the support by activating a photo-activable group of the probe.
2. Possibility to fix on DNA some molecules which produce a coloured deposit or light emission or fluorescence after excitation by a laser beam.
3. Possibility to adapt a compact disc reader for the reading of reflected or diffracted light in presence of a product resulting from an enzymatic reaction like peroxidase or for measuring photon emission.
4. Possibility to localize with accuracy a signal on the disc.
5. Use of apparatus universally spread and cheap for reading plates and for their manufacture.
6. Immediate treatment of data on a computer.



7. Huge potential for storing information like sequences to be detected
8. Possibility to adapt the system for other applications like detection of antibodies, antigens or receptors.

## **Performing the project**

### **1. Study for the grafting DNA probes on a disc**

The aim is to fix a DNA probe on a CD support at a well defined location. This is the step of addressing the probe. We would like to perform the probe addressing by using the accuracy obtained with a laser beam. The method that we advise is based on the property of azido-nitrophenyl chemical groups to be activated in presence of light and to react at the location where the illumination is localized. We have selected as compound sulfosuccinimidyl 6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)-hexanoate (sold by Pierce n° 22589).

This bifunctional agent comprises an N-hydroxysuccinimide group which reacts with free  $\text{NH}_2$  groups and thus can be fixed on aminated DNA probes. Its azido-nitrophenyl group can then be activated by light and be fixed on a support carrying amine functions. This application has just been published by Dontha et al. (Anal. Chem. 69, 2619, 1997) for the fixation of biotin bearing an azido-nitrophenyl group on a solid support by laser activation.

We will start to fix biotin on a CD coated with phthalate which has been activated by an azido-nitrophenyl group. The phthalate will be carboxylated then aminated by a method that we have developed and published in our laboratory (Zammatteo et al., Anal. Biochem. 236, 85-94, 1996; Zammatteo et al. Anal. Biochem., in press, 1997).

Biotin will be fixed on this support in presence of light and its fixation will be followed by a streptavidin-peroxidase complex. Peroxidase can be detected using a substrate which gives an coloured product (TMB), a substrate (luminol) which produces a photon by chemoluminescence or a substrate (DAB) which gives an insoluble product which precipitates where the peroxidase is localized. We will first use a soluble product and then an insoluble product in the assay.

Once we will have studied the conditions of illumination,  $\lambda$ , and concentration, we will perform the same experiment with a biotinylated DNA probe on which we will have fixed an azido-nitrophenyl group.

The phtalate layer will be dispensed on the top of a gold layer in order to obtain a reflection of the laser beam.

In parallel, we will investigate the fixation of probes directly on the gold layer functionalized with amino groups. Fixation of amino groups on gold is performed by contacting this surface with aminated derived alkanes. These alkyl chains stably adsorb on gold. This process will be preferred as compared to the phtalate because current CD-R can be used as they are already covered with a gold layer for light reflection.

## **2. Study of the size of the deposit formed on the disc**

The second step of the work is to perform deposits being the resulting product of peroxidase action and to optimize formation of deposits having a size close to micrometer, i.e. close to pits obtained by a CD (Rom) printing.

The tasks will be first performed on a support covered with biotin on which is fixed a streptavidin-peroxidase conjugate (see item 1).

We will study the size of the obtained product as well as their shape by electronic microscopy. Conditions of reaction, time, temperature, substrate concentration, will be adjusted in order to obtain deposit of about one micrometer.

We will use DNA probes which have been fixed on a CD (see item 1) and will perform precipitation of the product. In such case, we will vary the amount of probes fixed in order to investigate spacing between deposits on the disc. Ideally, we should obtain spacing between deposits in the range of 1 to 10 micrometer in order to have a reading structure very close to the CD (Rom) ones.

### **3. Study of the laser signal**

Deposits obtained on the CD surface should strongly modify reflection of the laser beam and thus produce a variation in detection by a photodiode. This variation will have to be registered as a reading value. This is the principle of reading the CD (Rom).

To achieve this task, we will illuminate a surface covered with gold and will study the reflection on a surface carrying or not a reaction deposit as described in item 2, and we will register the light variations. The reading will be performed by moving very slowly the plate thanks to an addressing system, in order to be able to follow the registration. This part requires an infrastructure for physical detection of lasers. This process will be similar to the one used in CD readers.

This work project represents a proposal relying on the literature and on available technical data. It is not excluded that during the course of the work, some parts would be modified and another strategy proposed if proved to be

more efficient. The essential is, in one hand, to propose an easy fixation and addressing of DNA probes on a CD and on the other hand to use a detection method possibly adapted to currently used CD readers.

### Work map

#### Feasibility study of the method

1. Study of the grafting of DNA probes on the disc
  - 1.1. Grafting by photo-activation of biotin using an azido-nitrophenyl-biotin compound.  
Detection by streptavidin-peroxidase conjugate.
  - 1.2. Grafting by photo-activation of a DNA probe bearing an azido-nitrophenyl group.  
Detection in radioactivity by photographic printing, detection by streptavidin-peroxidase conjugate using a biotinylated probe.
2. Study of the size of the deposit formed on the disc.

Use of a support covered with biotin and fixation of streptavidin-peroxidase conjugate. Study of the size of the deposit of a peroxidase product according to the time and substrate concentration.

The size of the deposit will be followed by electron microscopy and compared to the size of the pits of a printed CD (Rom).

The reaction conditions will be adjusted in order to obtain deposit having a size of about 1  $\mu\text{m}$ .

3. Study of the signal variation of a laser beam when directed on a deposit produced by peroxidase.

A laser beam similar to the one used in CD readers will be directed on the surface and variation in the intensity of reflected light will be measured.

**Persons being in charge of the convention (not paid by the convention)**

J. Remacle	Professor	occupied at 20 %
J.-J. Pireaux	Professor	occupied at 20 %
M. Dieu	Engineer	occupied at 30 %
E. Delaive	Technician A1	occupied at 20 %
Y. Houbion	Engineer	occupied at 20 %
I. Alexandre	Master in Sciences	occupied at 20 %

**Budget (in Kfrs)****Employee**

	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>Total</b>
1 PhD in Sciences (or Master with experience)	2400 (1 year)	1 200 (6 months)	3 600
1 PhD en Sciences (or Master with experience)	1 200 (6 months)	1 200 (6 months)	<u>2 400</u>
<b>Under-total</b>	<b>3 600</b>	<b>2 400</b>	<b>6 000</b>

**Lab budget**

	<b>1998</b> (1 year)	<b>1999</b> (6 months)	<b>Total</b>
Lab reagents and small material	1 600	1 000	3 600
Sub-contracting <sup>1</sup>	500	500	1 000
Travel (comprising USA)	150	150	300
<b>Under-total:</b>	<b>2 250</b>	<b>1 650</b>	<b>3 900</b>

<b>Overheads (5 %)</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>Total</b>
	293	203	496

**Material**

- Diode laser visible and semiconductor detector
- Diode laser - UV visible for addressing
- Addressing table and workstation for electronic control

<b>Total amount for assembly</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>Total</b>
	1 300	-	1 300

<sup>1</sup> (CD adapted to the grafting, Expertise laser)

---

<b>General total :</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>Total</b>
	<b>7 443</b>	<b>4 253</b>	<b>11 696</b>

**Justification of material**

- The diode laser visible (634 nm) and the detector will be used to measure laser reflection at the surface of the modified CD.
- The diode laser - UV visible will be useful to perform the addressing by activation of a photo-sensitive group.
- The addressing table will allow positioning the laser reading.
- The electronic control will be used to control the system and data acquisition.



**Plannification**

The first employee will be in charge of the grafting biochemistry and the study of the deposit product on a filter.

The second employee will be a physicist in charge of assembling parts to measure the laser reflection on the modified disc. He will be hired 6 months after the beginning of the project in order to be able to use discs already grafted.

The project period ranges from 1<sup>st</sup> January 1998 to 30 June 1999.

Steps of the work	1st six-month period (1998)	2nd six-month period (1998)	3rd six-month period (1999)
I	Step1 (1 Biochemist) →		
II		Step2 (1 Biochemist)	Step2 (1 Biochemist) →
III		Step 3(1physicist)	Step 3(1physicist) →

**Scientific interest**

The approach is very original and presents a scientific challenge, i.e. combining the technology of DNA probe assay based on the use of DNA probes and the technology of addressing and detection by a laser radiation.

Realization of this feasibility project relies on strong knowledge in each of the steps which will be investigated: the grafting of DNA probes is well known in our laboratory of biochemistry as well as the biochemical reactions based on the use of peroxidase. The studies of spectroscopic emissions are well developed in the laboratory LISE of Professor J.-J. Pireaux.